

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 28 OCT 2003

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 43 086.1

Anmeldetag: 16. September 2002

Anmelder/Inhaber: amaxa GmbH, Köln/DE

Bezeichnung: Vorrichtung und Verfahren zur Behandlung
von biologischem Material

IPC: C 12 M 1/42

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 8. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY

Schoz

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Zusammenfassung

- Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Behandlung von biologischem Material, zumindest bestehend aus einer nach außen zumindest verschließbaren Kammer mit einem Innenraum zur Aufnahme des biologischen Materials, wobei die Kammer zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes vorgesehen ist. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Behandlung
- 5 von biologischem Material, bei dem das biologische Material in den Innenraum einer nach außen zumindest verschließbaren Kammer eingebracht wird, welche zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes vorgesehen ist, welches nach dem Einbringen des biologischen Materials in dem Innenraum erzeugt wird durch
- 10 Anlegen einer Spannung an die Elektrode und eine weitere mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt stehende Elektrode. Die Kammer weist erfindungsgemäß zumindest eine Zuleitung auf, welche in räumlicher Nähe zu der Elektrode mindestens eine Öffnung aufweist. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird nach dem Erzeugen des elektrischen Feldes das biologische Material mittels einer
- 15 Lösung, die über eine Zuleitung der Kammer an zumindest einer Elektrode entlang geleitet wird, annähernd vollständig aus dem Innenraum der Kammer ausgespült.
- 20

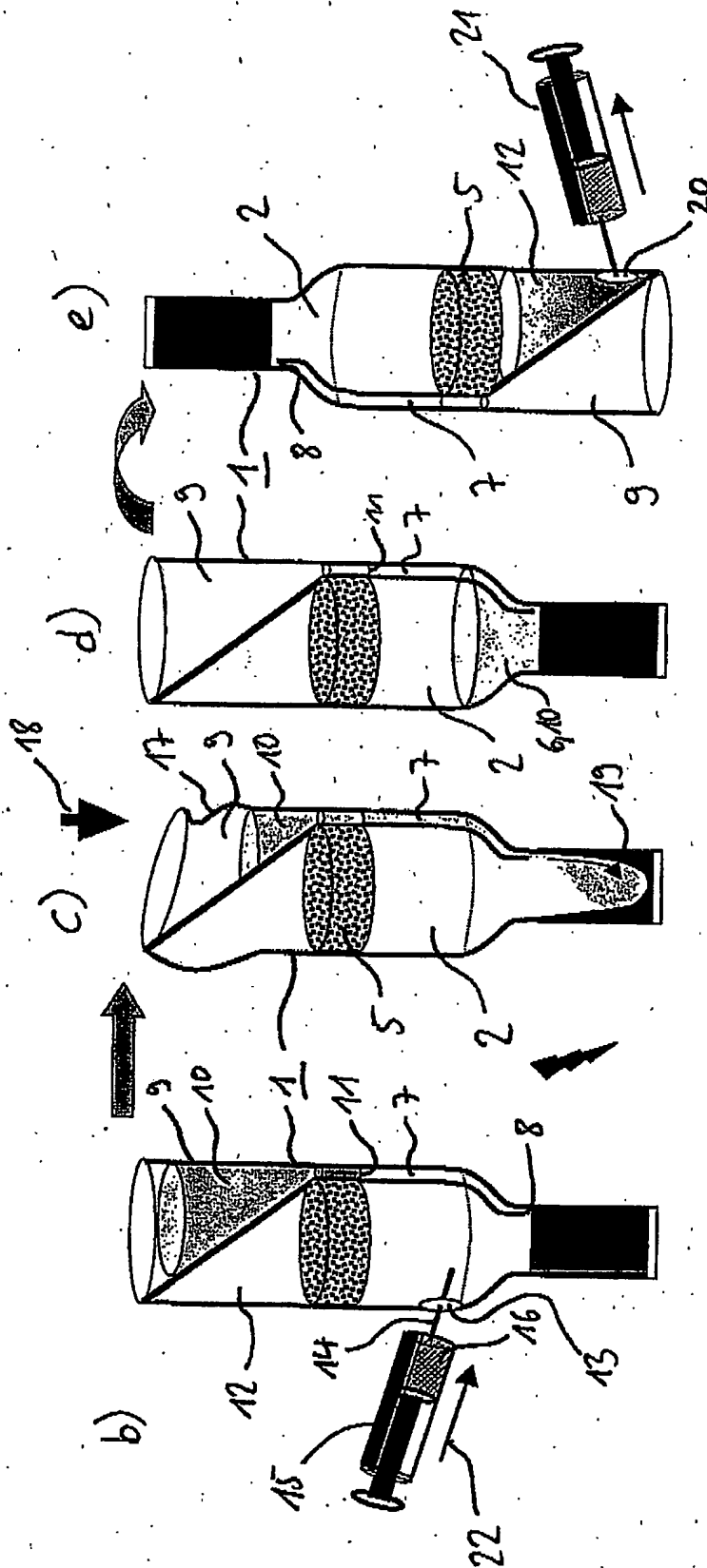


Fig. 1

Vorrichtung und Verfahren zur Behandlung von biologischem Material

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Behandlung von biologischem
5 Material, zumindest bestehend aus einer nach außen zumindest
verschießbaren Kammer mit einem Innenraum zur Aufnahme des biologischen
Materials, wobei die Kammer zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem
Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen
10 Feldes vorgesehen ist. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur
Behandlung von biologischem Material, bei dem das biologische Material in den
Innenraum einer nach außen zumindest verschießbaren Kammer eingebracht
wird, welche zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der
Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes
15 vorgesehen ist, welches nach dem Einbringen des biologischen Materials in
dem Innenraum erzeugt wird durch Anlegen einer Spannung an die Elektrode
und eine weitere mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt stehende
Elektrode.

Das Einbringen biologisch aktiver Moleküle, wie beispielsweise DNA, RNA oder
20 Proteine, in lebende Zellen stellt ein wichtiges Instrument zur Untersuchung
biologischer Funktionen dieser Moleküle dar. Eine bevorzugte Methode zum
Einbringen von Fremdmolekülen in die Zellen ist dabei die Elektroporation,
welche im Gegensatz zu chemischen Methoden nicht auf den gleichzeitigen
Transport anderer biologisch aktiver Moleküle angewiesen ist. Bei der
25 Elektroporation werden die Fremdmoleküle aus einer an die Zellen
angepassten Pufferlösung oder einem Zellkulturmedium durch einen
kurzzeitigen Stromfluss in die Zellen eingebracht, wobei durch die Wirkung der
kurzen elektrischen Impulse die Zellmembran für die Fremdmoleküle
durchlässig gemacht wird. Die Zellsuspension befindet sich dabei häufig in
30 einer sogenannten Küvette, d.h. einem schmalen, nach oben offenen Gefäß,
das in der Nähe ihres Bodens zwei gegenüberliegende, parallele Elektroden in
den Seitenwänden aufweist, welche zum Anlegen der elektrischen Spannung
dienen. Durch die kurzzeitig entstehenden „Poren“ in der Zellmembran

gelangen die biologisch aktiven Moleküle zunächst in das Zytoplasma, in dem sie ggf. bereits ihre zu untersuchende Funktion ausüben können, und daraufhin unter bestimmten Bedingungen auch in den Zellkern.

- 5 Durch das kurzzeitige Anlegen eines starken elektrischen Feldes, d.h. eines kurzen Pulses mit hoher Stromdichte, können darüber hinaus auch Zellen, Zellerivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel fusioniert werden. Bei dieser sogenannten Elektrofusion werden die Zellen beispielsweise zunächst durch ein inhomogenes elektrisches Wechselfeld in engen Membrankontakt gebracht.
- 10 Durch das anschließende Anlegen eines elektrischen Feldpulses kommt es dann zur Interaktion von Membranteilen, die schließlich zur Fusion führt. Für die Elektrofusion können dabei vergleichbare apparative Vorrichtungen verwendet werden, wie für die Elektroporation.
- 15 Vorrichtungen der eingangs genannten Art sind bekannt und werden vor allem bei der Elektroporation oder Elektrofusion in Form von Küvetten mit eingelegten Elektroden aus Metall eingesetzt. Die für diesen Zweck verwendeten Behälter sind meist schmale, nach oben offene Gefäße, deren Innenraum aus jeweils zwei Paaren parallel und gegenüberliegend angeordneter Seitenwände gebildet
- 20 wird. Der Innenraum dient dabei der Aufnahme der Zellsuspension, d.h. in der Regel einer wässrigen Pufferlösung oder eines Zellkulturmediums, in dem die zu behandelnden Zellen suspendiert sind. Zum Anlegen einer elektrischen Spannung weisen solche Küvetten zumeist im unteren Bereich eines Paares gegenüberliegender Seitenwände ein Elektrodenpaar auf. Bei einer
- 25 elektrischen Entladung fließt zwischen den beiden Elektroden ein elektrischer Strom durch die Zellsuspension, der einen Transport der Nukleinsäuren oder anderer Moleküle in die Zellen bewirkt oder je nach den gewählten Bedingungen zur Zellfusion führt. Die Elektroden bestehen dabei zumeist aus Metall, wobei häufig Aluminium verwendet wird.
- 30 Aus der DE 33 21 239 C2 ist beispielsweise eine Kammer zur Behandlung von Zellen im elektrischen Feld bekannt, die einen Innenraum zur Aufnahme einer lebenden Zellen enthaltenden Suspension aufweist, in den wenigstens zwei

Elektroden hineinragen. Die Elektroden dienen wie üblich dem Anlegen einer Spannung zur Erzeugung eines elektrischen Feldes zwischen den Elektroden, wobei die Zellen diesem elektrischen Feld ausgesetzt sind. Die Kammer ist zwar für die Fusion von Zellen vorgesehen, kann aber ebenso für das

5 Einschleusen von Nukleinsäuren in die Zellen, d. h. die sogenannte Elektroporation, verwendet werden. Der Innenraum der Kammer ist allseitig hermetisch verschlossen, wobei ein Bereich der den Innenraum umgebenden Wandung mittels einer Nadel oder Kanüle perforierbar ist. So kann die Wandung teilweise aus einer perforierbaren Folie aus Acetylcellulose bestehen.

10 Durch diese perforierbare Folie kann die Zellsuspension in die Kammer eingefüllt und aus dieser wieder entnommen werden. Dies hat den Vorteil, dass die Behandlung der Zellen unter sterilen Bedingungen erfolgen kann. Die Kammer kann allerdings nach der Behandlung der Zellen nur sehr umständlich und mit unbefriedigendem Ergebnis ausgespült werden, so dass stets ein nicht

15 unerheblicher Teil der behandelten Zellen im Innenraum der Kammer verbleibt.

Aus der DE 33 17 415 C2 ist ferner eine Kammer zur Behandlung von Zellen im elektrischen Feld bekannt, bei welcher der Innenraum von einem Innenkörper und einer den Innenkörper um dessen Längsachse mit gleichbleibendem

20 Abstand umschließenden Außenhülle begrenzt ist. Die in den Innenraum hineinragenden Elektroden umgeben den Innenkörper dabei in Form einer mehrgängigen Schraube mit gleichbleibender Steigung. Zum Einbringen der Zellsuspension in die Kammer weist diese eine verschließbare Zuleitung und zur Entnahme der Zellsuspension eine verschleißbare Ableitung auf. Diese

25 Kammer kann folglich auch als Durchflussskammer verwendet werden, indem eine vorbestimmte Menge der Zellsuspension in die Kammer gedrückt oder gesaugt wird, anschließend die elektrische Behandlung vorgenommen wird und schließlich die in der Kammer befindliche Zellsuspension aus der Kammer gedrückt oder gesaugt und durch eine neue Menge an Zellsuspension ersetzt

30 wird. Nach der elektrischen Behandlung der Zellen kann der Innenraum mit einer Reinigungslösung durchgespült werden, wobei die Reinigungslösung über ein Porensystem in den Innenraum gedrückt werden kann. Ein effektives Durchspülen der Kammer nach der elektrischen Behandlung der Zellen ohne

Verwendung einer Reinigungslösung, d. h. unter Erhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen, ist aber auch hier nicht möglich, da die Lösung nicht mit hoher Fließgeschwindigkeit an der gesamten Oberfläche der Elektroden vorbeifließen kann.

5

Aus der DE 35 22 610 C2 ist eine weitere Kammer für die Behandlung von Zellen im elektrischen Feld bekannt, bei der die den Innenraum zur Aufnahme der Zellsuspension bildenden Wände aus einer innenliegenden und einer außenliegenden Elektrode bestehen. Die Kammer weist eine durch einen Stopfen verschlossene Öffnung zum Einfüllen der Zellsuspension und eine Ausfüllöffnung zum Entnehmen der behandelten Zellen auf. Mittels einer Pipette kann dabei eine dosierte Menge der Zellsuspension in den Innenraum eingefüllt und anschließend elektrisch behandelt werden. Durch Einfüllen einer weiteren genau dosierten Lösungsmenge wird die behandelte Zellsuspension dann nach unten durch die Ausfüllöffnung aus dem Innenraum gedrückt. Aufgrund der Geometrie der Kammer und der Anordnung der Elektroden in Form einer innenliegenden und einer außenliegenden Elektrode ist aber auch hier ein Ausspülen der behandelten Zellen mit hoher Fließgeschwindigkeit nicht möglich.

20

Die US 4,849,089 beschreibt eine Kammer zur elektrischen Behandlung von Vesikeln, die durch eine kreisförmige Einfassung gebildet ist. Der Innenraum der Kammer zur Aufnahme der Zellsuspension wird durch einen von der Einfassung beabstandeten inneren Ring gebildet. Das zwischen der Einfassung und dem inneren Ring liegende isolierende Material ist von zwei Kanälen durchbrochen, die den Innenraum von außen zugänglich machen. Über diese Kanäle kann die Zellsuspension in den Innenraum eingefüllt und wieder entnommen werden. Die Elektroden bestehen jeweils aus kreisförmigen Platten, die von oben und von unten in die Einfassung eingelegt werden und den Boden bzw. den Deckel des Innenraums bilden. Aufgrund der kreisförmigen Geometrie des Innenraums und der oben bzw. unten liegenden Elektroden ist ein effektives Durchspülen und somit vollständiges Ausspülen der behandelten Zellen bei dieser Vorrichtung ebenfalls nicht möglich.

30

Die bisher bekannten Vorrichtungen und Verfahren zur Elektroporation und Elektrofusion haben den Nachteil, dass die behandelten Zellen oder Vesikel der Kammer nur unvollständig, d. h. mit relativ hohem Verlust an biologischem Material, wieder entnehmbar sind. Insbesondere, wenn die verwendeten

5 Spannungspulse eine sehr hohe Feldstärke aufweisen, d. h. das elektrische Feld eine hohe Stromdichte aufweist, lagert sich häufig Zellmaterial an den Elektroden, vor allem an der Kathode, ab. Darüber hinaus kommt es häufig zu einer starken Gasentwicklung, die zur Schaumbildung führt, was ebenfalls ein vollständiges Entnehmen der behandelten Zellen erschwert.

10 Es ist daher Aufgabe der Erfindung, eine Vorrichtung und ein Verfahren der eingangs genannten Art zu schaffen, welche die vorgenannten Nachteile vermeiden und eine möglichst vollständige Rückgewinnung der behandelten Zellen aus einer nach außen verschlossenen Kammer ermöglichen.

15 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe hinsichtlich der Vorrichtung dadurch gelöst, dass die Kammer zumindest eine Zuleitung aufweist, welche in räumlicher Nähe zu der Elektrode mindestens eine Öffnung aufweist. Durch diese besondere Anordnung kann der Innenraum der Kammer, auch in

20 geschlossenem Zustand und unter sterilen Bedingungen, sehr effektiv gespült werden, wobei insbesondere der kritische Bereich der Elektrode zunächst von der Lösung umspült wird. Hierdurch kann an den inneren Oberflächen der Kammer anhaftendes biologisches Material sehr effektiv abgelöst werden, was zu einer nahezu vollständigen Rückgewinnung des eingesetzten Materials führt.

25 Dies ist vor allem bei Anwendungen von Vorteil, bei denen kostbares, nur in begrenzten Mengen verfügbares Material verwendet wird.

Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die Zuleitung kanalförmig ausgebildet ist, d. h. einen im Verhältnis zu ihrer Längserstreckung geringen Querschnitt

30 aufweist. Durch eine solche Ausgestaltung kann eine hohe Fließgeschwindigkeit in der Zuleitung und damit auch an deren Öffnung erreicht werden.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung kann sich der innere Durchmesser der Zuleitung in Richtung der Elektrode verringern, was ebenfalls zu einer hohen Fließgeschwindigkeit an der Öffnung der Zuleitung und damit zu einem effektiven Spülvorgang führt. Die Verringerung des Durchmessers
 5 kann dabei allmählich und gleichmäßig über die gesamte Länge der Zuleitung erfolgen oder aber auf den Bereich in der Nähe der Öffnung beschränkt sein. Im letzteren Fall kann die Öffnung beispielsweise auch dösenartig ausgebildet sein.

10 In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass mindestens ein durch eine Wandung gebildetes Behältnis zur Aufnahme einer Lösung über die Zuleitung mit dem Innenraum zumindest verbindbar ist. Dies ist besonders dann von Vorteil, wenn die Behandlung der Zellen nicht in einem Zellkultumedium, sondern in einer für die elektrische Behandlung optimierten
 15 Pufferlösung durchgeführt wird. In diesem Fall ist es notwendig, die Pufferlösung kurz nach Abschluss der Behandlung mit einer Lösung zu verdünnen, die für die Zellen geeignet ist. Durch die direkte Verbindbarkeit des Behältnisses mit dem Innenraum ist sichergestellt, dass die Verdünnung der bei der Behandlung verwendeten Pufferlösung schnell und unkompliziert erfolgen
 20 kann.

Das Behältnis mit der Lösung zum Spülen der Kammer kann mit dem Innenraum verbunden werden, wobei der Innenraum der Kammer und das Behältnis durch eine Trenneinheit, durch welche die Lösung selektiv in den
 25 Innenraum der Kammer einbringbar ist, voneinander getrennt sein können. Dies ist vor allem dann von Vorteil, wenn das Behältnis mit dem Innenraum fest verbunden ist, da die Lösung erst dann in diesen gelangen soll, wenn die Behandlung der Zellen abgeschlossen ist. Die Trenneinheit kann dabei in vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung ein Ventil oder eine fragile, unter
 30 Druck zerstörbare Membran sein. Durch diese Ausgestaltung kann die Kammer durch einfache Manipulation von außen gespült werden, was vor allem bei Anwendungen unter sterilen Bedingungen von Bedeutung ist.

Für klinische Anwendungen, die unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden, ist vorgesehen, dass die Kammer nach außen zumindest keimdicht verschlossen ist. Wenn die Kammer als geschlossene Einheit transportiert werden und beispielsweise eine vorgelegte Pufferlösung, beispielsweise mit gelösten biologisch aktiven Molekülen, enthalten soll, so kann die Kammer zusätzlich noch flüssigkeits- und/oder gasdicht verschlossen sein.

Die das Behältnis bildende Wandung kann in einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung zumindest teilweise aus einem elastischen und/oder deformierbaren Material bestehen. Hierdurch kann auf die Lösung im Behältnis von außen ein Druck ausgeübt werden, so dass die Lösung mit hoher Fließgeschwindigkeit in die Zuleitung strömen kann. Wird die Lösung dagegen in alternativer Ausführung mittels Unterdruck aus dem Behältnis gesaugt, so kann die Wandung entsprechend der ausströmenden Lösung nachgeben.

Das Behältnis kann erfindungsgemäß an die Kammer zumindest anschließbar sein. Beispielsweise kann das Behältnis einstückig mit der Kammer verbunden sein, so dass beide als Einheit transportiert und verwendet werden können. Es kann aber auch über eine Anschlussvorrichtung, vorzugsweise einen Luer-Anschluss, an die Kammer anschließbar sein, so dass beide getrennt voneinander transportiert und aufbewahrt werden können. Im letzteren Fall können beispielsweise auch unterschiedliche Behältnisse, die beim Anwender bereits vorhanden sind, mit der erfindungsgemäßen Kammer verwendet werden. In einer vorteilhaften Ausführungsform bilden die Kammer und das Behältnis eine nach außen zumindest keimdicht verschlossene Einheit.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Kammer zumindest einen, vorzugsweise mit einer Kanüle, perforierbaren und selbstverschließenden Wandbereich aufweist und/oder mit zumindest einem Zugang mit einer Anschlussvorrichtung, vorzugsweise einem Luer-Anschluss, versehen ist. Über den derart ausgebildeten Wandbereich oder eine besondere Anschlussvorrichtung ist es beispielsweise möglich, eine Zellsuspension oder

anderes biologisches Material unter sterilen Bedingungen in den Innenraum der Kammer einzubringen.

5 Wenn die Kammer einen geringen Querschnitt aufweist und/oder schlangenförmig und/oder spiralförmig ausgebildet ist, führt dies zu einer hohen Fließgeschwindigkeit der Lösung im Innenraum, so dass die Rückgewinnung des biologischen Materials weiter verbessert werden kann.

10 In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung kann die Kammer durch mindestens eine Trenneinrichtung in mehrere Teilbereiche unterteilt sein. Dabei kann die Trenneinrichtung aus einem Ventil und/oder einer Filtereinheit bestehen.

15 Zur Aufnahme des behandelten biologischen Materials ist vorgesehen, dass ein Behälter an eine Ausgangsöffnung der Kammer zumindest anschließbar ist, d.h. beispielsweise entweder einstückig mit dieser verbunden oder über eine Anschlussvorrichtung, vorzugsweise einen Luer-Anschluss, an die Kammer anschließbar ist. Dabei kann zwischen der Kammer und dem Behälter eine Trennvorrichtung angeordnet sein. Die Trennvorrichtung besteht vorzugsweise
20 aus einem Ventil und/oder einer Filtereinheit. Das Filtermaterial ist dabei zweckmäßigerweise so zu wählen, dass das behandelte biologische Material durchgelassen, größere Partikel und Komplexe aber zurückgehalten werden. Aus diese Weise wird vermieden, dass störende, bei der elektrischen Behandlung entstandene Bestandteile in das Endprodukt gelangen, was vor
25 allem bei klinischen Anwendungen von Bedeutung ist.

Der Behälter weist in einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung zumindest einen, vorzugsweise mit einer Kanüle, perforierbaren und selbstverschließenden Wandbereich auf. Er kann aber alternativ auch mit
30 zumindest einem Ausgang mit einer Anschlussvorrichtung, vorzugsweise einem Luer-Anschluss, versehen sein. In beiden Fällen ist die einfache und sterile Entnahme des behandelten biologischen Materials aus dem Behälter möglich. Der Behälter kann beispielsweise auch eine Spritze oder ein Infusionsbeutel

sein, so dass das behandelte biologische Material beispielsweise bei klinischen Anwendungen der zu behandelnden Person direkt appliziert werden kann.

5 Behälter und Kammer können ferner eine nach außen keimdicht verschlossene Einheit bilden und somit gemeinsam transportiert und gelagert werden.

Der perforierbare, selbstverschließende Wandbereich der Kammer und/oder des Behälters besteht vorteilhafterweise aus einem Kunststoffmaterial, beispielsweise einem Silicon, einem Elastomer, Gummi oder einer
10 Kunststofffolie. Die Kunststofffolie kann beispielsweise aus Acetylcellulose bestehen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die Kammer zwei gegenüberliegende Elektroden aufweist, die jeweils mit dem
15 Innenraum in Kontakt stehen. Alternativ kann zusätzlich zu der, in dem Innenraum angeordneten Elektrode auch eine weitere Elektrode in den Innenraum der Kammer eingeführt werden.

Die Elektrode oder die Elektroden bestehen besonders bevorzugt aus einem
20 leitfähigen Kunststoffmaterial, vorzugsweise einem mit einem leitfähigen Material dotierten Kunststoff, so dass keine für lebende Zellen toxischen Metallionen aus den Elektroden austreten können. Dies wirkt sich bei der Behandlung von lebenden Zellen, insbesondere eukaryontischen Zellen, vorteilhaft auf die Überlebensrate der Zellen aus.

25 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe hinsichtlich des Verfahrens dadurch gelöst, dass nach dem Erzeugen des elektrischen Feldes das biologische Material mittels einer Lösung, die über eine Zuleitung der Kammer an zumindest einer Elektrode entlang geleitet wird, annähernd vollständig aus dem Innenraum der
30 Kammer ausgespült wird. Hierdurch kann an den inneren Oberflächen der Kammer anhaftendes biologisches Material, insbesondere im Bereich der Elektrode, sehr effektiv abgelöst werden, was zu einer nahezu vollständigen Rückgewinnung des eingesetzten Materials führt.

Dabei ist von Vorteil, wenn die Lösung mit hoher Fließgeschwindigkeit an der Elektrode entlang geleitet wird.

Da sich biologisches Material, insbesondere lebende Zellen, bevorzugt an der Kathode ablagern bzw. anheften, ist in vorteilhafter Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, dass die Lösung zunächst an der Kathode entlang geleitet wird.

In einer Ausgestaltung des Verfahrens ist ferner vorgesehen, dass das biologische Material mittels einer Spritze oder Ähnlichem durch einen perforierbaren, selbstverschließenden Wandbereich in den Innenraum der Kammer eingebracht wird.

In vorteilhafter Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, dass eine Trenneinheit, die den Innenraum der Kammer von einem die Lösung enthaltenden Behälter trennt, durch mechanische Manipulation von außen geöffnet wird, wobei das Behälter durch die Zuleitung mit der Kammer verbindbar oder verbunden ist. Auf diese Weise können die Lösung und die Kammer gemeinsam transportiert und aufbewahrt werden, ohne dass die Lösung ungewollt in den Innenraum gelangt. Das Spülen des Innenraums erfolgt also selektiv und kann in vorteilhafter Weise unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Darüber hinaus kann die Lösung sehr kurzfristig nach der elektrischen Behandlung in den Innenraum eingebracht werden, so dass ggf. eine auf die elektrische Behandlung optimierte Pufferlösung, die für das biologische Material weniger geeignet ist, schnell durch die Lösung verdünnt werden kann. Die Trenneinheit kann dabei ein Ventil, welches durch die mechanische Manipulation von außen zumindest in eine Richtung geöffnet wird, oder eine fragile Membran sein, die durch von außen ausgeübten Druck zerstört wird. Die fragile Membran besteht vorzugsweise aus einem Kunststoffmaterial, beispielsweise aus Polyvinyl, Polyester, Polyethylen oder Cellulosefolien. Das Kunststoffmaterial kann dabei mit Fluorohalocarbon beschichtet sein, das sich durch eine geringe Wasserdampfdurchlässigkeit bei guter mechanischer Zerstörbarkeit auszeichnet.

In vorteilhafter Ausgestaltung des Verfahrens ist ferner vorgesehen, dass das biologische Material und die Lösung in einen Behälter aufgenommen werden, der an eine Ausgangsöffnung der Kammer zumindest anschließbar ist. In diesem Behälter kann das behandelte Material dann der weiteren Verwendung auf einfache Weise direkt zugeführt werden.

In weiterer Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, dass ein die Lösung enthaltendes Behältnis zumindest teilweise durch eine elastische und/oder deformierbare Wandung gebildet ist und auf diese Wandung von außen ein Druck ausgeübt werden kann. Auf diese Weise wird die Lösung unter Druck in die Kammer gespült, was zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Verfahrens beiträgt. Der ausgeübte Druck kann ferner vorteilhafterweise dazu führen, dass die Trenneinheit, die den Innenraum der Kammer von dem die Lösung enthaltenden Behältnis trennen kann, geöffnet wird, so dass die Trennung auf einfache Weise und unter sterilen Bedingungen durchbrochen werden kann.

Das biologische Material kann ferner mit der Lösung aus dem Behältnis durch eine zwischen der Kammer und dem Behälter angeordnete Trennvorrichtung, insbesondere ein Ventil und/oder eine Filtereinheit, in den Behälter gespült werden, so dass der Spülvorgang selektiv und/oder unter Entfernung störender Bestandteile durchgeführt werden kann.

Insbesondere bei klinischen Anwendungen kann es vorteilhaft sein, wenn das behandelte biologische Material mittels einer Spritze oder Ähnlichem durch einen perforierbaren, selbstverschließenden Wandbereich des Behälters aus diesem entnommen wird. Hierdurch wird die erforderliche Sterilität gewährleistet und ferner eine einfache und unmittelbare Verwendbarkeit des behandelten Materials sichergestellt.

In alternativer Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, dass das biologische Material lebende Zellen, vorzugsweise eukaryontische Zellen, Zellerivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel sind, in welche durch das

Erzeugen des elektrischen Feldes biologisch aktive Moleküle, vorzugsweise Nukleinsäuren, eingebracht werden, oder die durch das Erzeugen des elektrischen Feldes fusioniert werden.

- 5 Die biologisch aktiven Moleküle können bereits in einer Pufferlösung gelöst sein und vor dem Einbringen des biologischen Materials, vorzugsweise bereits bei der Herstellung einer verwendbaren Kammer, in den Innenraum der Kammer eingebracht werden, was das Verfahren für den Anwender deutlich vereinfacht, da dieser lediglich noch das biologische Material zugeben muss.

10

In Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass das Einbringen der biologisch aktiven Moleküle in lebende Zellen, insbesondere direkt in den Zellkern, mit einer Stromdichte von bis zu 120 A/cm^2 , vorzugsweise 80 A/cm^2 , und/oder durch einen Spannungsimpuls mit einer Feldstärke von 2 bis 10 $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ und einer Dauer von 10 bis 200 μs erreicht wird.

15

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass das Einbringen der biologisch aktiven Moleküle in die Zellen durch einen auf den Spannungsimpuls ohne Unterbrechung folgenden Stromfluss mit einer Stromdichte von 2 bis 14 A/cm^2 , vorzugsweise 5 A/cm^2 , und einer Dauer von 1 bis 100 ms, vorzugsweise 50 ms, erreicht wird.

20

Die Erfindung wird im weiteren anhand der Figuren beispielhaft näher erläutert.

25

Es zeigt

Figur 1 Seitenansichten einer besonderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung in teilweise perspektivischer und teilweise geschnittener Darstellung, jeweils für unterschiedliche Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens,

30

- Figur 2 eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung in zwei geschnittenen Darstellungen, die jeweils zueinander um 90 Grad gedreht sind,
- 5 Figur 3 eine Vorderansicht einer weiteren Ausführungsform der Erfindung in geschnittener Darstellung,
- Figur 4 eine Seitenansicht der Ausführungsform gemäß Figur 3 in geschnittener Darstellung,
- 10 Figur 5 eine geschnittene Vorderansicht einer weiteren Alternative der erfindungsgemäßen Vorrichtung,
- Figur 6 eine geschnittene Ansicht eines Teils einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit schlangenförmiger Kammer,
- 15 Figur 7 eine schematische Darstellung einer Ausführungsform der Erfindung mit u-förmiger Kammer und
- 20 Figur 8 eine schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform der Erfindung.

Figur 1 zeigt Seitenansichten einer besonderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung in teilweise perspektivischer und teilweise geschnittener Darstellung. Bei dieser besonders vorteilhaften Ausführungsform stellt die erfindungsgemäße Vorrichtung eine allseitig keilm- und flüssigkeitsdicht verschlossene Einheit dar, die eine Behandlung der Zellen unter optimalen sterilen Bedingungen ermöglicht.

30 Figur 1a zeigt den unteren Bereich einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in geschnittener Darstellung. Dieser Bereich der Vorrichtung besteht aus einer Kammer 1, die einen Innenraum 2 aufweist, der zur Aufnahme von biologischem Material, beispielsweise einer Suspension lebender Zellen,

vorgesehen ist. In dem Innenraum 2 sind zwei planparallel eingelegte Elektroden 3, 4 angeordnet, die den Innenraum 2 im unteren Bereich der Kammer 1 an zwei Seitenflächen begrenzen. Im oberen Bereich weist die Kammer eine hier nur teilweise dargestellte Filtereinheit 5 auf, welche den Innenraum 2 gegenüber einem anderen Bereich der Vorrichtung abgrenzt. In dem Innenraum 2 kann beispielsweise eine Pufferlösung 6 enthalten sein, in der biologisch aktive Moleküle, beispielsweise Nukleinsäuren, gelöst sein können. Für Anwendungen in der Gentherapie können so beispielsweise in der Pufferlösung 6 gelöste DNA-Moleküle bereits in der Kammer enthalten sein. Der Anwender braucht dann lediglich die einem Patienten entnommenen Zellen in den Innenraum 2 der Kammer 1 einzufüllen und dann die DNA durch das Erzeugen eines elektrischen Feldes in die Zellen einzubringen.

Figur 1b zeigt eine perspektivische Seitenansicht der erfindungsgemäßen Vorrichtung gemäß Figur 1a, wobei die Vorrichtung hier gegenüber der Figur 1a um 90 Grad gedreht dargestellt ist. Die Elektrode 3 verdeckt in dieser Darstellung den Einblick in den unteren Bereich des Innenraums 2. In dieser Darstellung wird deutlich, dass die Kammer 1 eine Zuleitung 7 aufweist, deren Öffnung 8 in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den Elektroden 3, 4 angeordnet ist. Die Kammer 1 ist einstückig mit einem Behältnis 9 verbunden, welches eine Lösung 10 zum Ausspülen des Innenraums 2 der Kammer 1 enthält. Die Kammer 1 und das Behältnis 9 sind durch eine Trenneinheit 11 von einander getrennt. Bei dieser Trenneinheit 11 kann es sich beispielsweise um einen ventilartigen Verschluss oder eine fragile Membran handeln. Die Kammer 1 ist darüber hinaus einstückig mit einem Behälter 12 verbunden, der durch die Filtereinheit 5 vom Innenraum 2 der Kammer 1 getrennt ist. Der Behälter 12 und das Behältnis 9 bilden jeweils mit der Kammer 1 eine nach außen keim- und flüssigkeitsdicht verschlossene Einheit. Die Kammer 1 weist ferner einen perforierbaren Wandbereich 13 auf, durch den die Kanüle 14 einer Spritze 15 in den Innenraum 2 eingeführt werden kann. Die Spritze 15 kann beispielsweise eine Suspension 16 mit lebenden Zellen enthalten, die über die Kanüle 14 in den Innenraum 2 eingespritzt werden können. Durch Ausüben eines Druckes entlang der Richtung des Pfeils 22 wird die Zellsuspension in den Innenraum 2

gedrückt und steht somit für die nachfolgende elektrische Behandlung zur Verfügung. Bei den Zellen kann es sich beispielsweise um primäre Zellen aus dem Körper eines Patienten handeln, die zum Zwecke einer genetischen Therapie mit geeigneter DNA transfiziert werden sollen. Durch das Anlegen
 5 einer elektrischen Spannung an die Elektroden 3, 4 wird dann im Innenraum 2 ein geeignetes elektrisches Feld erzeugt, durch welches die DNA effektiv in die Zellen, insbesondere direkt in den Zellkern, eingebracht werden kann.

Figur 1c zeigt die erfindungsgemäße Vorrichtung gemäß Figur 1b nach der elektrischen Behandlung des biologischen Materials beim Durchspülen des
 10 Innenraums 2 der Kammer 1. Es wird hier deutlich, dass die Wandung 17 des Behältnisses 9 aus einem elastischen und deformierbaren Material, beispielsweise einem elastischen Kunststoff, besteht. Durch Ausüben von Druck auf die Wandung 17 entlang der Richtung des Pfeils 18 wird die
 15 Wandung 17 deformiert und somit ein Druck auf die Lösung 10 im Inneren des Behältnisses 9 ausgeübt. Durch diesen Druck kann die Trenneinheit 11 zwischen dem Behältnis 9 und der Kammer 1 geöffnet werden. Alternativ kann die Trenneinheit 11 aber auch durch eine andersartige Manipulation von außen geöffnet werden. Hierdurch gelangt die Lösung 10 durch die Zuleitung 7 in den
 20 Innenraum 2 der Kammer 1. Da die Öffnung 8 der Zuleitung 7 in der Nähe der hier nicht dargestellten Elektroden 3, 4 angeordnet ist, werden insbesondere die Elektroden 3, 4 intensiv von der Lösung 10 mit hoher Fließgeschwindigkeit umspült. Dabei kann durch den ausgeübten Druck auf die Wandung 17 die Fließgeschwindigkeit gezielt erhöht werden. Um Totvolumina im Innenraum 2
 25 zu vermeiden, ist die innere Oberfläche der Kammerwand 19 abgerundet ausgeformt, so dass ein optimales Durchspülen des Innenraums 2 ermöglicht wird. Auf diese Weise können die behandelten Zellen nahezu vollständig in der Lösung 10 suspendiert werden. Durch die Anordnung der Öffnung 8 in der Nähe beider Elektroden 3, 4 werden diese gleichmäßig gespült, wobei bei
 30 geringem Abstand zwischen den beiden Elektroden Verwirbelungen entstehen, die sich vorteilhaft auf den Spülvorgang auswirken. In alternativer Ausgestaltung kann die Öffnung aber auch näher an einer Elektrode liegen, bei der es sich dann vorzugsweise um die Kathode handelt. Aufgrund der

besonders vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden also auch an den Wänden und Elektroden anheftende Zellen abgelöst, wobei ein Suspendieren der Zellen auch bei durch hohe Feldstärken verursachter Schaumbildung gewährleistet ist.

5

Figur 1d zeigt die erfindungsgemäße Vorrichtung gemäß Figur 1b nach dem Durchspülen des Innenraums 2 der Kammer 1 mit der Lösung 10. Durch Drehen der Vorrichtung um 180 Grad kann nunmehr die Lösung 10 mit den suspendierten behandelten Zellen vom Innenraum 2 über die Trenneinheit 5 in den Behälter 12 gelangen. Dieser Zustand ist in Figur 1e dargestellt. Alternativ kann das Drehen der erfindungsgemäßen Vorrichtung um 180 Grad auch bereits vor dem Spülvorgang erfolgen, wobei dann ein etwas höherer Druck auf die Lösung 10 ausgeübt werden muss, damit diese entgegen der Schwerkraft zunächst in den Innenraum 2 der Kammer 1 gedrückt werden kann. Wenn die Trenneinheit 5 wie im dargestellten Beispiel aus einer Filtereinheit besteht, können größere Partikel im Innenraum 2 zurückgehalten werden, so dass ggf. störende Einflüsse auf die behandelte Zellsuspension vermieden werden. Der Behälter 12 weist wie die Kammer 1 ebenfalls einen perforierbaren Wandbereich 20 auf, über den die Zellsuspension mittels einer Spritze 21 aus dem Inneren des Behälters 12 entnommen werden kann. Dabei ist die Trichterform des Behälters 12 von Vorteil, da die mit der Zeit sedimentierenden Zellen sich im unteren Bereich konzentrieren und somit auch in konzentrierter Form entnommen werden können. Die sterile Suspension mit den behandelten Zellen kann also auf diese Weise einem Patienten schnell, in konzentrierter Form und auf einfache Weise appliziert werden.

Figur 2 zeigt eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung in zwei geschnittenen Darstellungen, die jeweils zueinander um 90 Grad gedreht sind. Die dargestellte Vorrichtung besteht aus einer Kammer 25 mit einem Innenraum 26, der eine Zellsuspension 27 und/oder biologisch aktive Moleküle in gelöster Form enthält. Die Kammer weist ferner zwei flache Elektroden 28, 29 mit planer Oberfläche auf, welche parallel zueinander an gegenüberliegenden Seitenwänden der Kammer 25 angeordnet sind. In der

Darstellung gemäß Figur 2a ist dabei nur die hinter der Schnittebene angeordnete Elektrode 28 sichtbar. Die Kammer 25 weist zwei Anschlussvorrichtungen 30, 31 auf, die an gegenüberliegenden Enden der Kammer 25 angeordnet sind. Das Einbringen der Zellsuspension 27 erfolgt über

5 die Anschlussvorrichtung 31 vorzugsweise aus einem Behälter, dessen Kanüle eine Länge aufweist, die ungefähr der Stärke der Anschlussvorrichtung 31 entspricht, so dass im Innenraum 26 beim Einbringen der Zellen kein Totvolumen entsteht. Die Kanüle kann dabei eine Membran oder ähnliches durchstechen, welche den Innenraum 26 nach außen verschließt. An die

10 Anschlussvorrichtung 30 ist ein Behältnis 32 anschließbar, wobei es sich bei dem Behältnis 32 beispielsweise um eine Spritze oder Ähnliches handeln kann. Das Behältnis 32 kann auch elastisch verformbar sein, damit seine Wandung nachgiebig ist, wenn die Lösung in alternativer Ausgestaltung durch einen

15 mittels des Behälters 40 im Innenraum 26 erzeugten Unterdruck aus dem Behältnis 32 herausgesaugt wird. Die Anschlussvorrichtung 30 weist eine Ausnehmung 34 auf, in welche die Kanüle 33 des Behältnisses 32 einführbar ist. Die Ausnehmung 34 kann dabei beispielsweise durch einen Stopfen verschließbar sein oder am Übergang zur Zuleitung 36 mit einem Ventil oder

20 einer fragilen Membran verschlossen sein, das bzw. die von der Kanüle 33 durchstoßen wird. Auf diese Weise kann die in dem Behältnis 32 enthaltene Lösung 35 in die Zuleitung 36 der Kammer 25 eingebracht werden. Über die Öffnung 37 der Zuleitung 36 gelangt die Lösung 35 dann in den Innenraum 26, wobei die Elektrode 29 sehr intensiv von der Lösung 35 umspült wird. Vorteilhafterweise handelt es sich bei der Elektrode 29 um die Kathode, an die

25 sich bei der Elektroporation von Zellen im besonderen Maße Zellmaterial anheftet und bei herkömmlichen Vorrichtungen nur schwer zu entfernen ist. Wie aus Figur 2a zu entnehmen ist, ist die innere Oberfläche 38 der Kammerwand 39 abgerundet ausgebildet, so dass keine Totvolumina entstehen. Auf diese Weise wird ein effektives Durchspülen des Innenraums 26 gewährleistet. Die

30 mittels der Lösung 35 verdünnte Zellsuspension 27 wird dann in den Behälter 40 aufgenommen, so dass in einer Ausführungsform das Spülen und das Entnehmen der Zellen in zwei Schritten erfolgt. Alternativ kann die Lösung auch durch einen mittels des Behälters 40 im Innenraum 26 erzeugten Unterdruck

aus dem Behälter 32 durch den Innenraum 26 über die Elektroden 28, 29 in den Behälter 40 gesaugt werden, so dass Spülung und Entnahme hier in einem Schritt erfolgen. Die Kanüle 41 des Behälters 40, bei dem es sich beispielsweise um eine Spritze oder ähnliches handeln kann, wird wie bei der Anschlussvorrichtung 30 in eine Ausnehmung 42 der Anschlussvorrichtung 31 eingeführt. Bei den Anschlussvorrichtungen 30, 31 kann es sich beispielsweise auch um Luer-Anschlüsse handeln, an die auf bekannte Weise beispielsweise Spritzen oder Infusionsbeutel angeschlossen werden können. Die Anschlussvorrichtungen 30, 31 können aber beispielsweise auch perforierbare Gummistopfen sein.

Figur 3 zeigt eine Vorderansicht einer weiteren Ausführungsform der Erfindung in geschnittener Darstellung. Die dargestellte Vorrichtung besteht aus einer Kammer 45 mit einem Innenraum 46 und zwei planparallel angeordneten Elektroden 47, 48. Die Kammer 45 weist hier zwei Zuleitungen 49, 50 auf, die jeweils parallel zueinander in den Randbereichen der Kammer 45 angeordnet sind. Über die Zuleitungen 49, 50 kann eine Lösung zum Spülen des Innenraums 46 eingeleitet werden. Die Zuleitungen 49, 50 können aber beispielsweise auch für das Einbringen des biologischen Materials in den Innenraum 46 und anschließend für das Einleiten der Lösung verwendet werden. Die Zuleitungen werden über einen kanalförmigen Überlauf, d.h. den länglichen Überlaufkanal 59 gespeist, was nachfolgend unter Figur 4 näher erläutert wird. Zwischen den beiden Zuleitungen 49, 50 ist eine Ausgangsöffnung 51 angeordnet, über welche der Inhalt des Innenraums 46 der Kammer 45 wieder entnommen werden kann. Der Kammerinhalt strömt dabei in einen länglichen Ablaufkanal 60, der nachfolgend unter Figur 4 näher dargestellt ist. Zwischen dem Innenraum 46 und dem Ablaufkanal 60 ist hier eine Trennvorrichtung 61 angeordnet, bei der es sich beispielsweise um einen Membranfilter handeln kann.

Figur 4 zeigt eine Seitenansicht der Ausführungsform gemäß Figur 3 in geschnittener Darstellung. Es wird hier deutlich, dass die Kammer 45 langgestreckt ausgebildet ist, so dass sie zur Aufnahme größerer Volumina

geeignet ist. Dabei verläuft die Elektrode 48, wie auch die hier nicht sichtbare Elektrode 47, bei geringer Höhe über die gesamte Länge der Kammer 45. Der Überlaufkanal 59 ist eingangsseitig mit einem Behälter verbindbar und leitet eine Lösung aus dem Behälter in die hier nicht sichtbaren Zuleitungen
 5 (Bezugsziffern 49 und 50 in Figur 3). Die Zuleitungen erstrecken sich spaltartig ebenfalls über die gesamte Länge der Kammer 45. Dabei weisen die Zuleitungen einen engeren Querschnitt als der Überlaufkanal 59 auf, so dass sich in den Zuleitungen ein über die gesamte Länge der Kammer 45 gleichmäßiger Druck aufbauen kann, wenn der Überlaufkanal mit der Lösung
 10 gefüllt ist. Der parallel zum Überlaufkanal 59 verlaufende Ablaufkanal 60 ist ablaufseitig mit einem Behälter verbindbar, der das behandelte und durch die Lösung ausgespülte biologische Material aufnimmt.

Figur 5 zeigt eine weitere Alternative der Erfindung, die im wesentlichen der
 15 Vorrichtung gemäß den Figuren 3 und 4 entspricht, wobei hier aber nur eine Zuleitung 52 vorgesehen ist. Die Öffnung 53 der Zuleitung 52 ist hier in unmittelbarer Nähe der Elektrode 54 angeordnet, wobei es sich bei dieser vorzugsweise um die Kathode handelt. Die Zuleitung 52 wird hier durch den Kanal 62 mit der Lösung gespeist, wobei die Lösung mit dem behandelten
 20 Material durch die Trennvorrichtung 64 und den Kanal 62 wieder entnommen werden kann.

Figur 6 zeigt eine geschnittene Ansicht eines Teils einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit schlangenförmiger Kammer 55. Die Elektroden sind hier nicht
 25 dargestellt, können aber beispielsweise vor und hinter der Schnittebene angeordnet sein. Die Kammer 55 besteht aus einer kanalförmigen Zuleitung 56 und einer kanalförmigen Ableitung 57, welche jeweils an den Enden des schlangenförmigen Innenraums 58 angeordnet sind. Zuleitung 56 und Innenraum 58 weisen hier einen gleichförmigen, geringen Querschnitt auf, was
 30 zu einer hohen Fließgeschwindigkeit im Innenraum 58 und an den Oberflächen der hier nicht dargestellten Elektroden führt. Auf diese Weise kann die Kammer sehr effektiv und gründlich ausgespült werden. Dabei kann sich der innere

Durchmesser der Zuleitung 56 in Richtung des Innenraums 58 verjüngen, so dass sich die Fließgeschwindigkeit der Lösung im Innenraum 58 erhöht.

Figur 7 zeigt eine weitere Ausführungsform der Erfindung, bei der die Kammer 65 u-förmig ausgebildet ist. Die hier nicht dargestellten Elektroden sind bei dieser Ausführungsform vor und hinter der Schnittebene angeordnet. Die Lösung wird über die Zuleitung 67 in den Innenraum 66 eingebracht, wobei aufgrund des geringen Querschnitts der Kammer 65 eine hohe Fließgeschwindigkeit erreicht werden kann. Über die Ableitung 68 wird die Lösung mit dem behandelten biologischen Material aus der Kammer 65 gedrückt oder abgesaugt.

Figur 8 zeigt eine alternative Ausführungsform der Erfindung, die im wesentlichen der in Figur 7 dargestellten entspricht. Die Zuleitung 76 der Kammer 75 weist hier aber einen deutlich größeren Querschnitt als die Ableitung 77 auf, so dass hiermit größere Volumina verarbeitet werden können.

Bezugszeichenliste:

- | | | |
|----|----|----------------------|
| | 1 | Kammer |
| | 2 | Innenraum |
| 5 | 3 | Elektrode |
| | 4 | Elektrode |
| | 5 | Filtereinheit |
| | 6 | Pufferlösung |
| | 7 | Zuleitung |
| 10 | 8 | Öffnung |
| | 9 | Behältnis |
| | 10 | Lösung |
| | 11 | Trenneinheit |
| | 12 | Behälter |
| 15 | 13 | Wandbereich |
| | 14 | Kanüle |
| | 15 | Spritze |
| | 16 | Suspension |
| | 17 | Wandung |
| 20 | 18 | Pfeil |
| | 19 | Kammerwand |
| | 20 | Wandbereich |
| | 21 | Spritze |
| | 22 | Pfeil |
| 25 | 25 | Kammer |
| | 26 | Innenraum |
| | 27 | Suspension |
| | 28 | Elektrode |
| | 29 | Elektrode |
| 30 | 30 | Anschlussvorrichtung |
| | 31 | Anschlussvorrichtung |
| | 32 | Behältnis |
| | 33 | Kanüle |

- 34 Ausnehmung
- 35 Lösung
- 36 Zuleitung
- 37 Öffnung
- 5 38 Oberfläche
- 39 Kammerwand
- 40 Behälter
- 41 Kanüle
- 42 Ausnehmung
- 10 45 Kammer
- 46 Innenraum
- 47 Elektrode
- 48 Elektrode
- 49 Zuleitung
- 15 50 Zuleitung
- 51 Ausgangsöffnung
- 52 Zuleitung
- 53 Öffnung
- 54 Elektrode
- 20 55 Kammer
- 56 Zuleitung
- 57 Ableitung
- 58 Innenraum
- 59 Überlaufkanal
- 25 60 Ablaufkanal
- 61 Trennvorrichtung
- 62 Kanal
- 63 Kanal
- 64 Trennvorrichtung
- 30 65 Kammer
- 66 Innenraum
- 67 Zuleitung
- 68 Ableitung

75 Kammer
76 Zuleitung
77 Ableitung.

Patentansprüche

- 5 1. Vorrichtung zur Behandlung von biologischem Material, zumindest bestehend aus einer nach außen zumindest verschließbaren Kammer mit einem Innenraum zur Aufnahme des biologischen Materials, wobei die Kammer zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen
- 10 Feldes vorgesehen ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zumindest eine Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) aufweist, welche in räumlicher Nähe zu der Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) mindestens eine Öffnung (8, 37, 53) aufweist.
- 15 2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) kanalförmig ausgebildet ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sich der innere Durchmesser der Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) in
- 20 Richtung der Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) verringert.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein durch eine Wandung (17) gebildetes Behältnis (9, 32) zur Aufnahme einer Lösung über die Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76)
- 25 mit dem Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) zumindest verbindbar ist.
5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) und das Behältnis (9, 32) durch eine Trenneinheit (11) voneinander getrennt sind,
- 30 durch welche die Lösung selektiv in den Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) einbringbar ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Trenneinheit (11) ein Ventil ist oder dass die Trenneinheit (11) eine fragile Membran ist, die unter Druck zerstörbar ist.
- 5 7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) nach außen zumindest keimdicht verschlossen ist.
- 10 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die das Behältnis (9, 32) bildende Wandung (17) zumindest teilweise aus einem elastischen und/oder deformierbaren Material besteht.
- 15 9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Behältnis (9, 32) an die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zumindest anschließbar ist, beispielsweise einstückig mit dieser verbunden oder über eine Anschlussvorrichtung (30, 31), vorzugsweise einen Luer-Anschluss, an die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) anschließbar ist.
- 20 10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) und das Behältnis (9, 32) eine nach außen zumindest keimdicht verschlossene Einheit bilden.
- 25 11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zumindest einen, vorzugsweise mit einer Kanüle (14, 33, 41), perforierbaren und selbstverschließenden Wandbereich (13, 20) aufweist und/oder mit zumindest einem Zugang mit einer Anschlussvorrichtung (30, 31), vorzugsweise einem Luer-Anschluss, versehen ist.
- 30 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) einen geringen

Querschnitt aufweist und/oder schlangenförmig und/oder spiralförmig ausgebildet ist.

- 5 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) durch mindestens eine Trenneinrichtung in mehrere Teilbereiche unterteilt ist.
- 10 14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Trenneinrichtung aus einem Ventil und/oder einer Filtereinheit (5) besteht.
- 15 15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass ein Behälter (12, 40) an eine Ausgangsöffnung (51) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zumindest anschließbar ist, beispielsweise einstückig mit dieser verbunden oder über eine Anschlussvorrichtung (30, 31), vorzugsweise einen Luer-Anschluss, an die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) anschließbar ist.
- 20 16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) und dem Behälter (12, 40) eine Trennvorrichtung (61, 64) angeordnet ist.
- 25 17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennvorrichtung (61, 64) aus einem Ventil und/oder einer Filtereinheit (5) besteht.
- 30 18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter (12, 40) zumindest einen, vorzugsweise mit einer Kanüle (14, 33, 41), perforierbaren und selbstverschließenden Wandbereich (13, 20) aufweist und/oder mit zumindest einem Ausgang mit einer Anschlussvorrichtung (30, 31), vorzugsweise einem Luer-Anschluss, versehen ist.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter (12, 40) eine Spritze oder ein Infusionsbeutel ist.
- 5 20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter (12, 40) und die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) eine nach außen keimdicht verschlossene Einheit bilden.
- 10 21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass der perforierbare, selbstverschließende Wandbereich (13, 20) aus einem Kunststoffmaterial, beispielsweise einem Silicon, einem Elastomer oder Gummi, besteht.
- 15 22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zwei gegenüberliegende Elektroden (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) aufweist, die jeweils mit dem Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) in Kontakt stehen, oder dass eine weitere Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) in den Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) einführbar ist.
- 20 23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) oder die Elektroden (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) aus einem leitfähigen Kunststoffmaterial, vorzugsweise einem mit einem leitfähigen Material dotierten Kunststoff, besteht.
- 25 24. Verfahren zur Behandlung von biologischem Material, bei dem das biologische Material in den Innenraum einer nach außen zumindest verschließbaren Kammer eingebracht wird, welche zumindest eine Elektrode aufweist, die mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt steht und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes vorgesehen ist, welches nach dem Einbringen des biologischen Materials in dem Innenraum erzeugt wird durch Anlegen einer Spannung an die Elektrode und eine
- 30

- weitere mit dem Innenraum der Kammer in Kontakt stehende Elektrode, dadurch gekennzeichnet, dass nach dem Erzeugen des elektrischen Feldes das biologische Material mittels einer Lösung, die über eine Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) an zumindest einer Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) entlang geleitet wird, annähernd vollständig aus dem Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) ausgespült wird.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung mit hoher Fließgeschwindigkeit an der Elektrode (3, 4, 28, 29, 47, 48, 54) entlang geleitet wird.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung an der Kathode entlang geleitet wird.
27. Verfahren nach Anspruch 24, 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass das biologische Material mittels einer Spritze oder Ähnlichem durch einen perforierbaren, selbstverschließenden Wandbereich (13, 20) in den Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) eingebracht wird.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 27, gekennzeichnet durch das Öffnen einer Trenneinheit (11) durch mechanische Manipulation von außen, wobei die Trenneinheit (11) den Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) von einem die Lösung enthaltenden Behältnis (9, 32) trennt, welches durch die Zuleitung (7, 36, 49, 50, 52, 56, 67, 76) mit der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) verbindbar oder verbunden ist.
29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Trenneinheit (11) ein Ventil ist, welches durch die mechanische Manipulation von außen zumindest in eine Richtung geöffnet wird, oder

dass die Trenneinheit (11) eine fragile Membran ist, die durch von außen ausgeübten Druck zerstört wird.

- 5 30. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 29, gekennzeichnet durch das Aufnehmen des biologischen Materials und der Lösung in einem Behälter (12, 40), der an eine Ausgangsöffnung (51) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) zumindest anschließbar ist.
- 10 31. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass ein die Lösung enthaltendes Behältnis (9, 32) zumindest teilweise durch eine elastische und/oder deformierbare Wandung (17) gebildet ist und auf diese Wandung (17) von außen ein Druck ausgeübt wird.
- 15 32. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass das biologische Material durch eine zwischen der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) und dem Behälter (12, 40) angeordnete Trennvorrichtung (61, 64), insbesondere ein Ventil und/oder eine Filtereinheit (5), in den Behälter (12, 40) gespült wird.
- 20 33. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass das behandelte biologische Material mittels einer Spritze oder Ähnlichem durch einen perforierbaren, selbstverschließenden Wandbereich (13, 20) des Behälter (12, 40)s aus diesem entnommen wird.
- 25 34. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass das biologische Material lebende Zellen, vorzugsweise eukaryontische Zellen, Zellderivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel sind, in welche durch das Erzeugen des elektrischen Feldes biologisch aktive Moleküle, vorzugsweise Nukleinsäuren, eingebracht werden, oder die durch das Erzeugen des elektrischen Feldes fusioniert werden.
- 30

35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass die biologisch aktiven Moleküle in einer Pufferlösung gelöst sind und vor dem Einbringen des biologischen Materials in den Innenraum (2, 26, 46, 58, 66) der Kammer (1, 25, 45, 55, 65, 75) eingebracht werden.
- 5
36. Verfahren nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, dass das Einbringen der biologisch aktiven Moleküle in lebende Zellen mit einer Stromdichte von bis zu 120 A/cm^2 , vorzugsweise 80 A/cm^2 , und/oder durch einen Spannungsimpuls mit einer Feldstärke von 2 bis 10 kV*cm^{-1}
- 10
- und einer Dauer von 10 bis $200 \mu\text{s}$ erreicht wird.
37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass das Einbringen der biologisch aktiven Moleküle in die Zellen durch einen auf den Spannungsimpuls ohne Unterbrechung folgenden Stromfluss mit einer Stromdichte von 2 bis 14 A/cm^2 , vorzugsweise 5 A/cm^2 , und einer Dauer von 1 bis 100 ms, vorzugsweise 50 ms, erreicht wird.
- 15

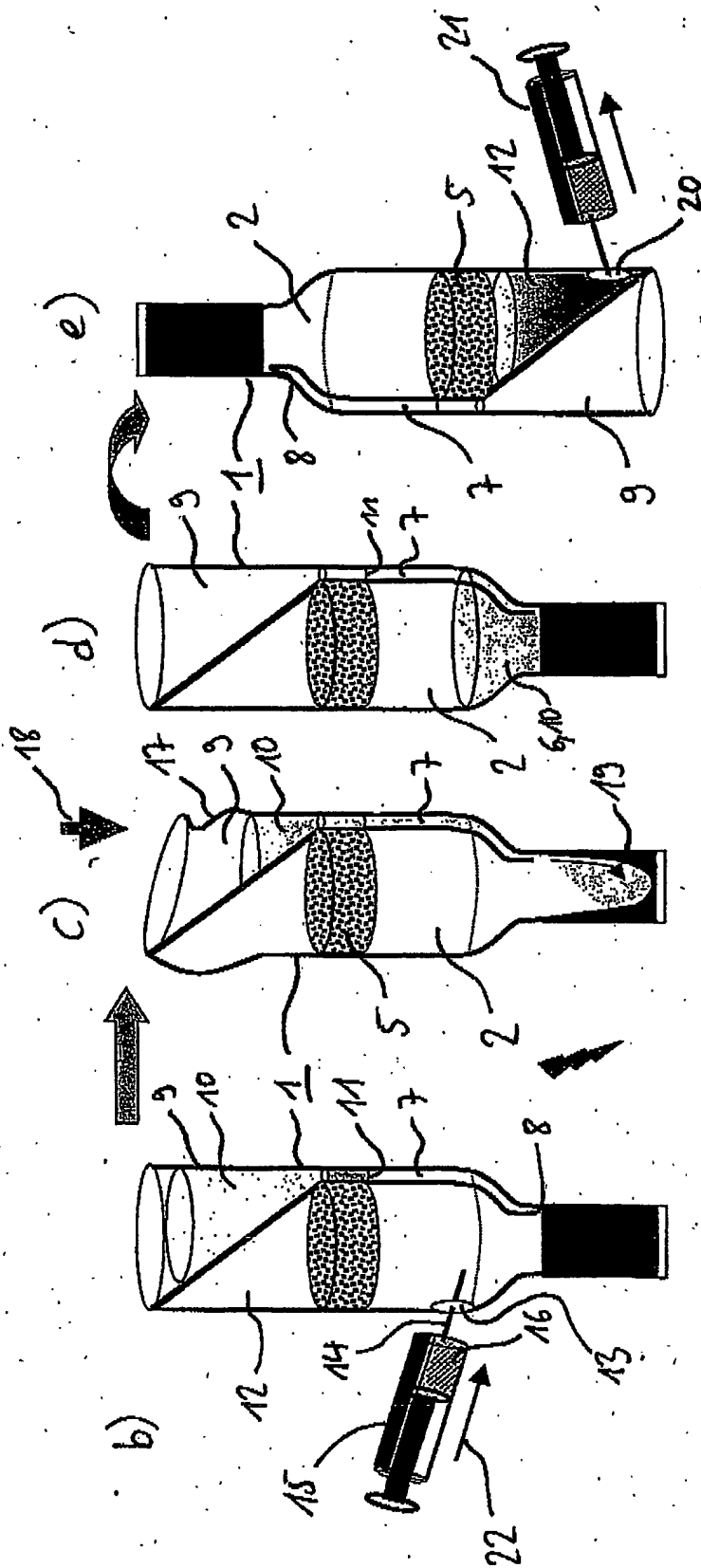
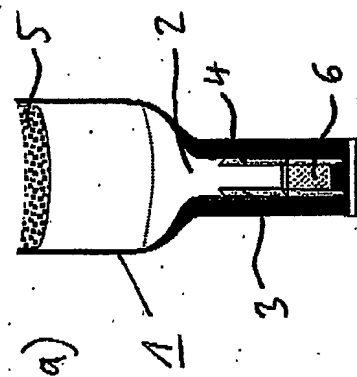


Fig. 1



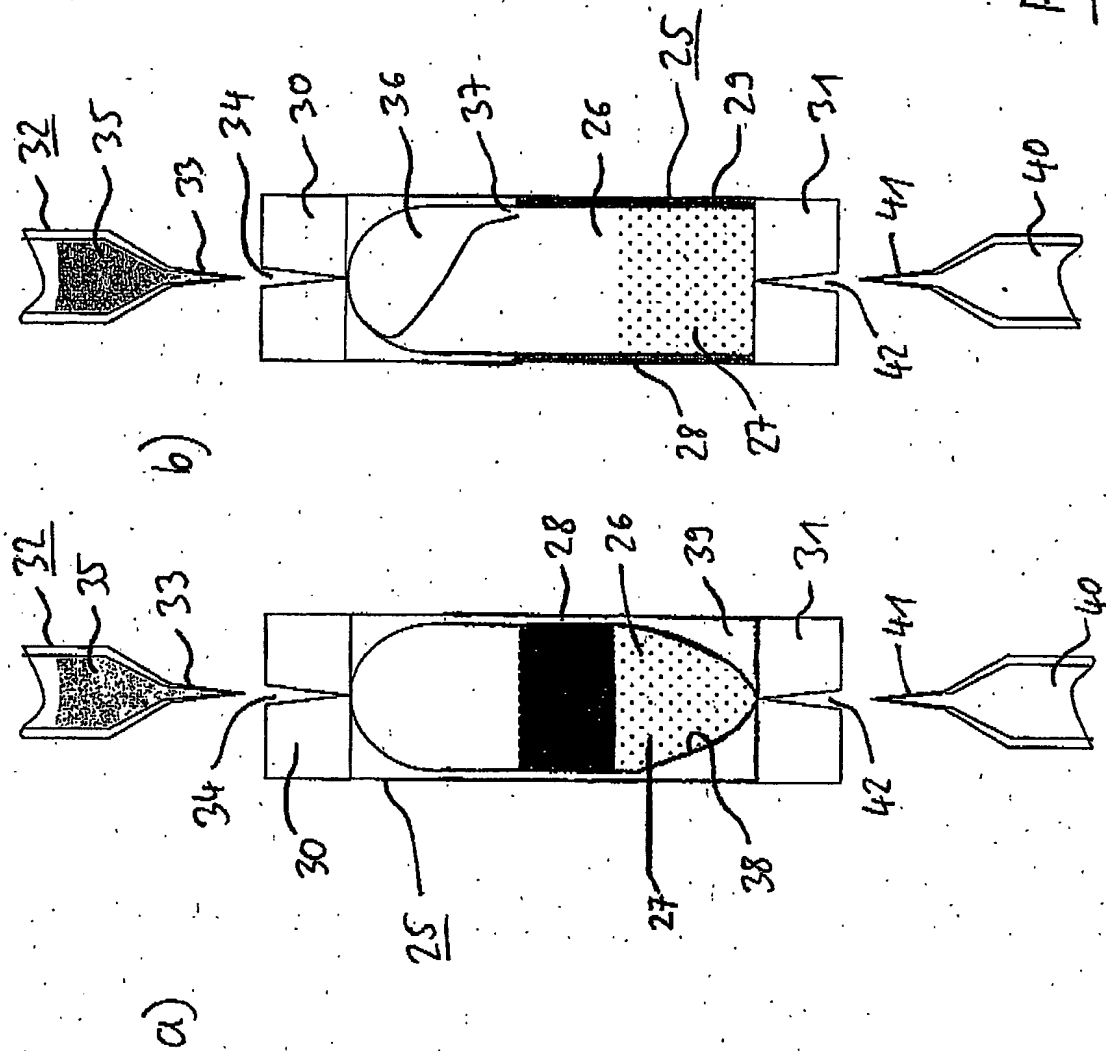


Fig. 4

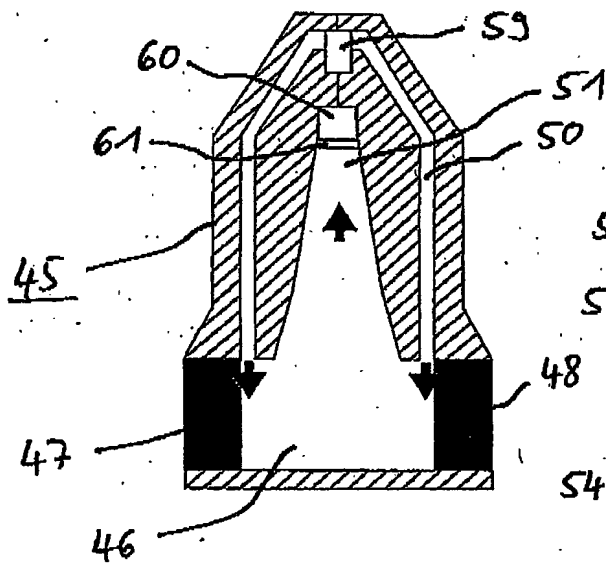
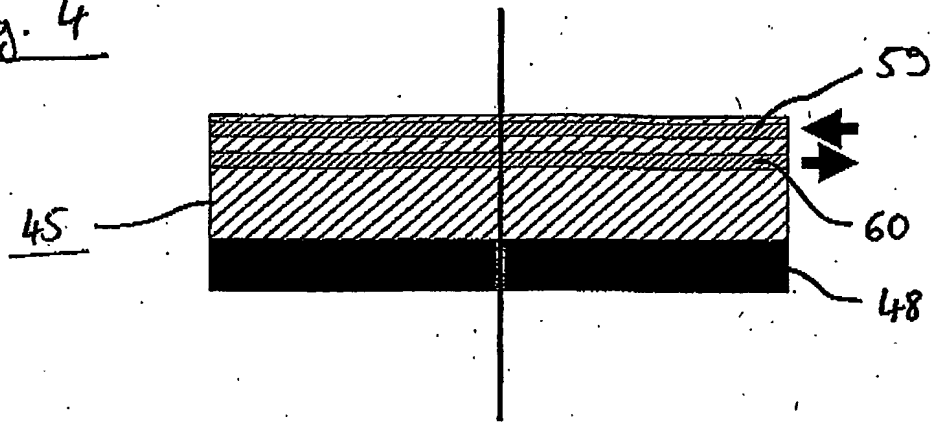


Fig. 3

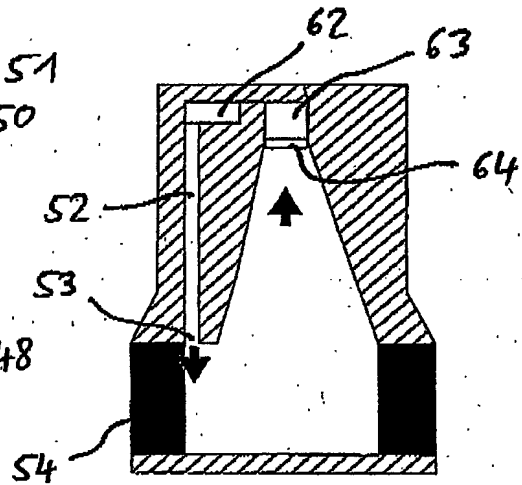


Fig. 5

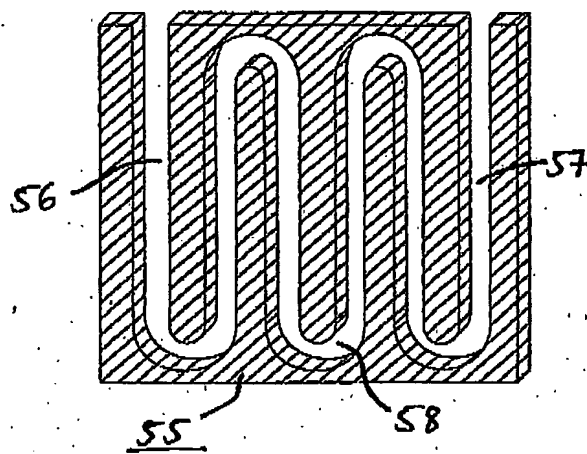


Fig. 6



Fig. 7

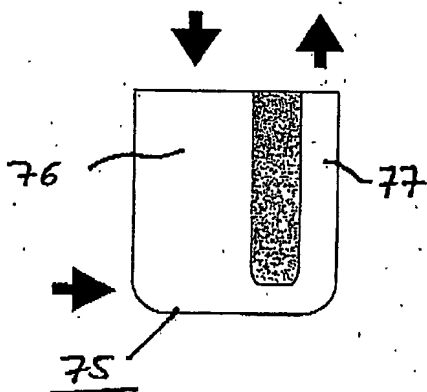
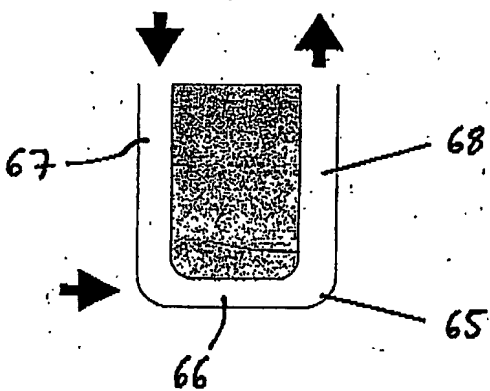


Fig. 8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.